

原著 ホルマリン固定パラフィン標本を用いたmRNA 発現解析の検討

著者	郷野 辰幸, 清野 祐子, 大庭 華子, 黒住 昌史 , 山口 ゆり, 林 慎一
雑誌名	東北大学医学部保健学科紀要
巻	18
号	2
ページ	101-110
発行年	2009-07
URL	http://hdl.handle.net/10097/44361

ホルマリン固定パラフィン標本を用いた mRNA 発現解析の検討

郷野辰幸¹, 清野祐子^{1,2}, 大庭華子³, 黒住昌史^{2,3},
山口ゆり², 林 慎一¹

¹東北大学大学院医学系研究科 分子機能解析学

²埼玉県立がんセンター 臨床腫瘍研究所

³埼玉県立がんセンター 病理部

mRNA Expression Analysis Extracted from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples

Tatsuyuki GOHNO¹, Yuko SEINO^{1,2}, Hanako OBA³, Masafumi KUROSUMI^{2,3},
Yuri YAMAGUCHI² and Shin-ichi HAYASHI¹

¹Department of Molecular and Functional Dynamics, Graduate School of Medicine, Tohoku University

²Research Institute for Clinical Oncology, Saitama Cancer Center

³Department of Pathology, Saitama Cancer Center

Key words: real-time PCR, Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

The analysis of mRNA expression is important and useful in the field of molecular genetics. Several target genes of estrogen receptor in breast cancer have been identified and used for prognostic diagnosis and therapy. To apply these techniques to retrospective analysis, we tried to extract RNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) and determined the expression level. Tissue pieces were sliced off from 6 FFPEs prepared in different years and stored since 1993 to 2006. Then total RNA from each sample was extracted with a specialized kit. The extracted RNA had sufficient concentration and purity for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The expression levels in the FFPEs were determined by real-time PCR using synthesized cDNA from the extracted mRNA except one case because of the RNA degradation. We proved that mRNA expression level can be determined by extraction from FFPE prepared and stored in the appropriate manner. Although FFPE has been considered not suitable for expression analysis, our results revealed that sufficient RNA remains in FFPE for the analysis. FFPE is prepared and stored in most medical institutes and therefore reliable RNA analysis in FFPE is expected to be a new diagnostic tool for breast cancer.

はじめに

乳癌の発生や進行には、エストロゲンの影響で

発現が変動する遺伝子群による細胞の増殖や浸潤、転移能の獲得などが密接に関わっていることが明らかとなってきた。その機序は、まずエスト

ロゲンが核内に到達して核内レセプターであるエストロゲンレセプター (ER) に結合することから始まる。エストロゲンが結合した ER はその高次構造が変化し、転写抑制因子の解離や転写共役活性化因子の結合を誘起する。その結果、エストロゲン応答配列 (ERE) を転写調節領域にもつ遺伝子の転写や Sp1, AP-1 結合配列を介した他の転写因子の活性が促進され、これらが相互作用することで様々な遺伝子の発現が誘導される。乳癌の治療にはこれら経路の起点であるエストロゲンシグナルをブロックする方法が有効であり、抗エストロゲン剤やアロマターゼ阻害剤などを用いた各種ホルモン療法が効果をあげている^{1,2)}。

これらのホルモン療法の適用や使い分けは ER 発現の有無、ER の標的遺伝子であるプロゲステロンレセプター (PgR) 発現の有無が主な指標とされているが、近年ではさらにヒト上皮細胞増殖因子受容体 type 2 (Her2/neu) 発現の有無により抗エストロゲン剤とアロマターゼ阻害剤の効果に違いが現れるといった新たな要素も加わるなど、症例ごとの多様性の検討が必要になってきた³⁾。現在これらの指標は免疫染色によるタンパク発現の有無で判定されているものの、遺伝子転写レベルとの相関が明確に示されているわけではない。実際最近の我々の研究では GFP を利用した ER 活性化能測定と免疫染色の結果が一致しない臨床例が見受けられ(未発表)、その原因の解明も待たれている。

そこで、我々はこれら診断、予後因子の発現が EIA や免疫染色によってタンパクレベルで既に評価されているサンプルを対象とし、新たに mRNA レベルで解析した結果と比較して相関を検討する研究を開始した。すなわち症例の多様化に対応するために、これまで診断に用いられてきた ER の免疫染色や活性化能のみならず、その下流にある標的遺伝子の mRNA 発現プロファイルという第3の視点を加えて解析することにより、3要素の関係から新たな治療や予後の基準を検索することが目的である (図1)。各遺伝子の機能は mRNA の発現によって調節されており、現在 mRNA の解析は多くの疾患において診断や予後

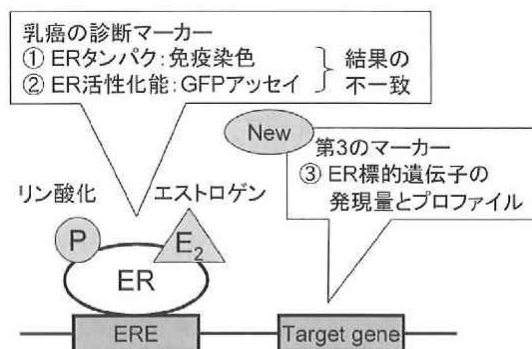


図1. 乳癌の診断マーカーの概略図

これまで乳癌における診断や予後は、① 免疫染色による ER タンパク自体の強度と量で判定されてきた。② GFP アッセイを用いた ER 活性化能 (エストロゲンのようなリガンドの結合やリン酸化) 測定の併用も検討しているが、これらの結果が一致しない症例も存在する。我々は新たに ③ ER の標的遺伝子の発現量とプロファイルを解析することで、症例群の多様化に対応したより正確な基準の作成を目的としている。

の判定に利用されている。それは乳癌においても例外ではなく、上記 ER や PgR, Her2 などを含む様々な因子の発現量の測定による予後の診断は既に実用化されつつあり、実際に欧米では Mamma-Print (Agendia 社) や OncotypeDX (Genomic Health 社) のようなサンプル診断解析サービスが提供されている。

RNA は非常に不安定で分解されやすい物質である。解析にはなるべく劣化が少なく純度の高いものが望ましいことから、これまでの研究や診断ではもっぱら新鮮凍結切片や培養細胞から抽出したサンプルが用いられてきた。しかし本解析のような条件において、そのような新鮮なサンプルの入手は困難である。そこで我々は免疫染色用のサンプルとして保管されていたホルマリン固定パラフィン標本 (Formalin-Fixed Paraffin-Embedded; FFPE) に注目した。

作製までに様々な工程を経る FFPE を用いた RNA 解析は、一般に困難とされてきた⁴⁾。保管中に RNA 自体が損傷、劣化することに加えて⁵⁾、固定時のホルマリン自体に多少ながら RNA の分解

作用があることや、ホルマリンによって RNA の酸化や修飾が促進されることで⁶⁾、解析可能な RNA を保持しているサンプルとしてみなされていなかった。しかし近年、FFPE にもある程度の RNA が保存され、それを抽出して解析に用いるという報告がみられるようになった^{7,8)}。上述の乳癌予後診断サービス OncotypeDX も扱うサンプルは FFPE であり、その解析結果は臨床において高い信頼度で利用されている。

本研究では前記したような mRNA 発現解析を行うために、まず FFPE から実際に RNA を抽出し、それが解析に耐えうる品質かどうか、どれくらいの期間保存された FFPE まで使用可能か、そして実際に定量解析が可能かの検討を行った。この解析で高い信頼性をもった結果が得られるとき、新たに FFPE という膨大な資産を生かす手法が提示される。

材料および方法

1. 対象材料

埼玉県立がんセンター病院にて 1993 年、2002 年、2006 年に作製された乳癌手術検体のパラフィンブロックを 2 サンプルずつ、計 6 サンプルを使用した。

本研究では乳癌組織そのものを用いた実験はすべて埼玉県立がんセンターにて行い、東北大学では抽出した total RNA の逆転写以降の実験、解析のみを行った。乳癌手術検体は埼玉県立がんセン

ターにおいてインフォームドコンセント後に文書により同意が得られたもののみを使用し、機関の倫理審査委員会が定めた手続きに従った。

埼玉県立がんセンター：受付番号 216、平成 20 年 10 月 21 日承認

東北大学：受付番号 2008-442、平成 21 年 1 月 13 日承認

2. 組織からの total RNA 抽出

表 1 に示す通り FFPE をターゲットとしたゲノム抽出キットは様々なものが市販されているが、我々は RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion) を選択し、キットのプロトコルに従って使用した。その概略を図 2 に示す。

埼玉県立がんセンター病理部に保管されていた FFPE から切片を厚さ 40 μm で 1 枚切り出し、エッペンドルフチューブに入れたのちキャップを閉めて、チューブごと液体窒素につけて冷却した。キシレンとエタノールで脱パラフィンを行い、風乾したのちキットに付属している Buffer と Protease を加えて 50°C で 3 時間反応させ組織を溶解した。溶解反応停止後は反応液をカラムに移し、遠心して RNA をフィルタに吸着させ、Wash Buffer を 2 回通した。フィルタに DNase を加えて反応させたのち、さらに Wash Buffer で 3 回洗浄した。経験上、抽出溶媒を高温度にすると収率が向上するため、抽出は 95°C に温めた DNase RNase free water で 30 μl を 2 回、計 60 μl で行った。

表 1. 市販されている主な FFPE からの RNA 抽出キット

パラフィン包埋組織からの mRNA 抽出キット		
製品名 (メーカー)	原理	メリット/デメリット
RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Ambion)	フィルタ吸着	○ 処理できるサンプル量が多い/純度が高い × 時間がかかる/値段が高い
RNeasy FFPE Kit (QIAGEN)	カラム吸着	○ 収量が多い/純度が高い × 時間がかかる/値段が高い
WaxFree Paraffin Sample RNA Extraction Kit (Funakoshi)	液層分離	○ 抽出が短時間/脱パラ不要 × 純度が低い

FFPE を用いた遺伝子解析がにわかに注目され、抽出キットもいくつか販売されている。その抽出方法は多様で、目的や予算、サンプル数により使い分けるのが妥当と思われる。

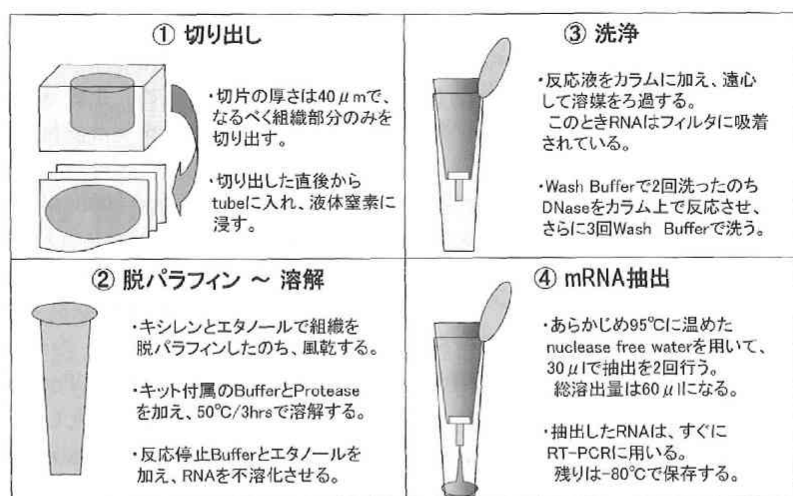


図2. ブロックの薄切から total RNA 抽出までの流れ

3. real-time PCR に用いる cDNA の合成

組織から抽出した total RNA 1 μ g から、TaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 3.0 (TaKaRa) を用いてキットのプロトコールに従って逆転写反応を行い、cDNA を合成した。

4. real-time PCR

合成した cDNA を用いて、乳癌に関係するエストロゲン応答遺伝子について、SYBR Green を蛍光指標としたインターカレーター法にて mRNA 発現解析を行った。

ターゲットは10遺伝子で、RPL13A をインターナルコントロールとして補正を行った。FFPE に含まれる RNA は100~200 bp まで切断されているという報告をもとに^{9,10)}、各遺伝子のプライマーは PCR 産物サイズがなるべく小さくなるようにデザインした。加えて FFPE に含まれる RNA は作製段階や保管中の分解により絶対量が低下していることが予想されるため、増幅サイクル数は45回と多めに設定した。なおこの反応において、Negative Control として用いた H₂O での増幅はみられなかった。

以下の表2, 3 に反応条件と測定した各遺伝子の名称、プライマー濃度と配列を記載する。プライマー濃度以外の反応条件はすべて同じである。

表2. real-time PCR の反応条件
反応系 (Total 20 μ L)

2×PCR Master Mix	10 μ L
primer F/R	300~500 nM
Sample	200 ng
H ₂ O	適宜

反応時間	
Holding Stage	95°C, 1 分間
Cycling Stage	↓
	95°C, 15 秒間
	60°C, 1 分間
	↓
Melt Curve Stage	95°C, 15 秒間
	60°C, 1 分間
	↓
	95°C, 15 秒間

反応系は 20 μ l で、キットと測定装置のプロトコールに従った。FFPE は RNA が分解されて測定値が低くなることが予想されるため、PCR サイクル数は45回と多めに設定している。プライマー濃度以外の反応条件は、サンプル間に変更していない。

表 3. mRNA 発現解析に用いたプライマー情報

標的遺伝子	使用濃度 (final nM)	プライマー配列		アンプリコン サイズ (bp)
RPL13A	500	F	5' CCT GGA GGA GAA GAG GAA AG 3'	126
		R	5' TTG AGG ACC TCT GTG TAT TT 3'	
BCL-2	300	F	5' GTG GAT GAC TGA GTA CCT GAA C 3'	119
		R	5' GCC AGG AGA AAT CAA ACA 3'	
Efp	300	F	5' CAT CTC TCA AGG CCA AGG 3'	136
		R	5' GCT ACT GTA TAG CAC TCT GAG A 3'	
EGR3	500	F	5' GAG CAG TTT GCT AAA CCA AC 3'	138
		R	5' AGA CCG ATG TCC ATT ACA TT 3'	
ER α	500	F	5' CTC CCA CAT CAG GCA CAT 3'	94
		R	5' CTC CAG CAG CAG GTC ATA 3'	
HDAC6	300	F	5' GTC TAC TGT GGT CGT TAC ATC 3'	114
		R	5' GGC CTG ACA GTA GTA ACA C 3'	
HER2	500	F	5' CGC TGA ACA ATA CCA CCC 3'	96
		R	5' AGA CCC CTC CTT TCA AGA 3'	
IGFBP4	300	F	5' CCA CGA GGA CCT CTA CAT CATA C 3'	111
		R	5' ACA CAC CAG CAC TTG CCA C 3'	
IGFBP5	500	F	5' TCT CTG CAC CTG AGA TGA GA 3'	128
		R	5' GTC ACA ATT GGG CAG GTA 3'	
MIB-1 (Ki67)	300	F	5' GTC TCT GGT AAT GCA CAC TC 3'	99
		R	5' TCC ACA TGG ATT TCT GAA C 3'	
PgR	500	F	5' AGC TCA CAG CGT TTC TAT CA 3'	101
		R	5' CGG GAC TGG ATA AAT GTA TTC 3'	

FFPEに含まれるRNAは損傷を受けて分断されているため、PCR増幅産物のサイズは短めの100 bp程度にデザインしてある。RPL13Aをインターナルコントロール、それ以外を発現解析のターゲットとした。

結果と考察

1. FFPE中のRNAの品質についての検討

まず切り出した切片から得られるtotal RNA量を確認するため、各サンプルから抽出したtotal RNAの濃度と純度(OD 260 nm/280 nm比)をNanoDrop (Thermo Scientific 社)を用いて測定した(表4)。年度が古いものほどRNAが劣化、分

解して収量が低下することが予想されたが、No.2のように1993年に作製されたブロックでも20 μ g以上のtotal RNAを抽出でき、かつ高純度であった。反対にNo.6のような2006年という比較的最近に作製されたブロックでも10 μ g前後の収量しか得られず、かつ純度も低いといった結果もみられたため、RNA抽出について作製された時期の新古が問題ということは一概にはいえない。

表 4. 各サンプルにおける抽出 total RNA 量

Sample No.	抽出 total RNA 量 (μg)	260/280	ブロック作製年度
1	9.410	1.96	1993
2	24.733	1.95	
3	16.927	1.98	2002
4	27.385	1.90	
5	18.173	1.92	2006
6	11.075	1.87	

OD 比 260/280 は、RNA の場合 2.0 に近いほど純度が高いとされる。どのブロックでも RNA 収量、純度ともに総じて高値を示したが、作製からの経過年数と収量や純度に相関傾向はみられなかった。

サンプル間でばらつきはみられたものの、収量、純度とも逆転写を行うには十分であったため、ブロックからサンプルを切り出す際に設定した 40 μm 切片 1 枚という採取量は概ね妥当であったといえる。

次に抽出した total RNA から RT-PCR で合成した cDNA を 0.1 μg 用いて実際に real-time PCR 法によるエストロゲン応答遺伝子の発現定量解析を行ったところ、サンプルごとに様々な結果が得られた。

通常 RNA の品質を判断するときは RNA Analyzer のような機器を用いて直接判定を行うが、今回は簡易的に RNA の品質を判定する基準として、インターナルコントロールである RPL13A の発現量に注目した。サンプル間の差が小さく常に一定量発現しているインターナルコントロールの場合、その測定値が低いほど相対的に RNA の分解が進行していると考えることができる。そこで各サンプルの RPL13A の絶対定量値を比較すると、それらの値は同一年度でも大きな差がみられ、またその値の高低は RNA 抽出時の収量や純度と同じくブロック作製からの経過年数とほとんど関係しないように思われた (図 3A)。特に No. 1 は多くのサンプルと 100 倍以上の開きがあり、検出ポイントも検量線外に大きく外れていたため、RNA の分解が非常に進んでいるものと

判断した (図 3B)。No. 1 はインターナルコントロール以外の遺伝子についても異常な測定値を示したことから、インターナルコントロールを用いた RNA 品質判定は概ね信用してよいといえる。このことから、たとえ抽出時に高純度で多量の RNA が得られたとしても、それが必ずしも RNA の品質の良否を示すものではないということが確認された。

2. FFPE の保存期間についての検討

No. 1 のように RNA に大きな損傷を受けている検体が存在することが確認されたものの、1993 年に同じ過程で作製、保管されていたもう一方のサンプル No. 2 は解析に十分に使用できる品質であった。抽出以降の実験は 6 サンプル同時に行ったため、少なくとも本実験の過程が特定のサンプルにのみ RNA の損失や劣化という影響を与えたとは考えにくい。これらのことから FFPE 中の RNA の品質は、作製時期ではなく固定法や保管条件などを含めたブロックそのものの状態で決定されるといえる。その中でも各サンプル間で大きく異なるのはおそらく固定時間であり、特に前述したようなホルマリンによる FFPE への影響を考慮すれば、なるべく長時間の固定は避けることが望ましいと思われる。

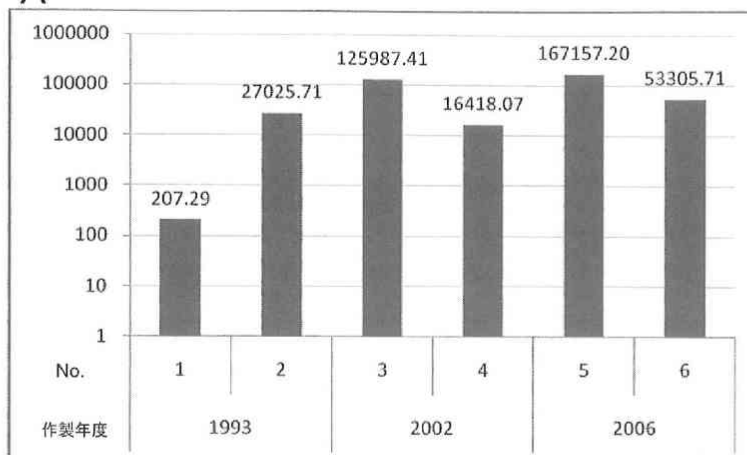
対象遺伝子によっては約 80 年前に作製された FFPE でも検出に成功したという報告もあり¹¹⁾、適切に作製、保管されたサンプルであれば、作製年度や保存期間に関わらず高品質な RNA が得られる可能性が高いといえる。

3. FFPE を用いた発現解析についての検討

RPL13A の絶対定量値が極端に低い No. 1 は品質不良として解析する際の基準算出からは除外し、それ以外の 5 サンプルについて各項目の平均値を求め、その値を基準に発現量の増減を比較した (図 4)。No. 1 を除く 5 サンプルは RPL13A の定量値の高さから程度の差はあるが RNA が高品質で保存されていると判断でき、そのため各遺伝子の定量値についても信頼性は高いと考えられる。

今回は研究の目的から臨床症状によらず無作為にサンプルを選択したこともあり、サンプルに

A



B

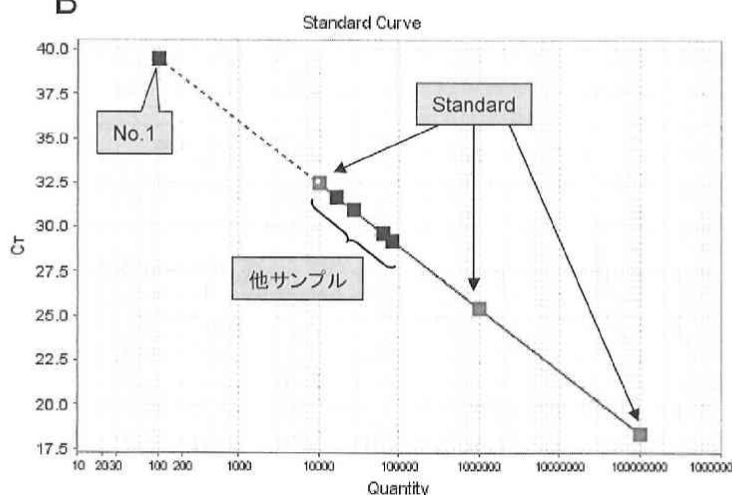


図 3. 各サンプルの RPL13A (インターナルコントロール) 絶対定量値

常に一定量発現しているインターナルコントロールの定量値の差は、すなわちサンプル間の相対的な RNA 損傷、分解の度合いの目安になる。A) 測定値はサンプルによって様々で、作製年度との関連はほぼみられなかった。B) No. 2~6 のサンプルの測定値は、各々差はあるが一定以上の高値を示し、かつ検量線の範囲内に収まった。ここから今回の解析ではこれらの RNA 品質は十分保たれていると判断し、逆に検量線から大きく外れた No. 1 は RNA の分解が進行していると判断した。

よって遺伝子の mRNA 発現プロファイルは様々で、例えば ER α と MIB-1 の逆相関や¹²⁾、ER α の発現がみられたサンプルはその標的遺伝子である HDAC6 や IGF1BP3 も高いといった臨床報告と一致するデータが見受けられる一方で、それらと

は全く異なる発現様式を示すデータもみられるなど、個人の症例の多様性や個性をうかがうことができる。

さらに、乳癌の予後診断の指標となっている ER と PgR について、結果を以前行われた EIA

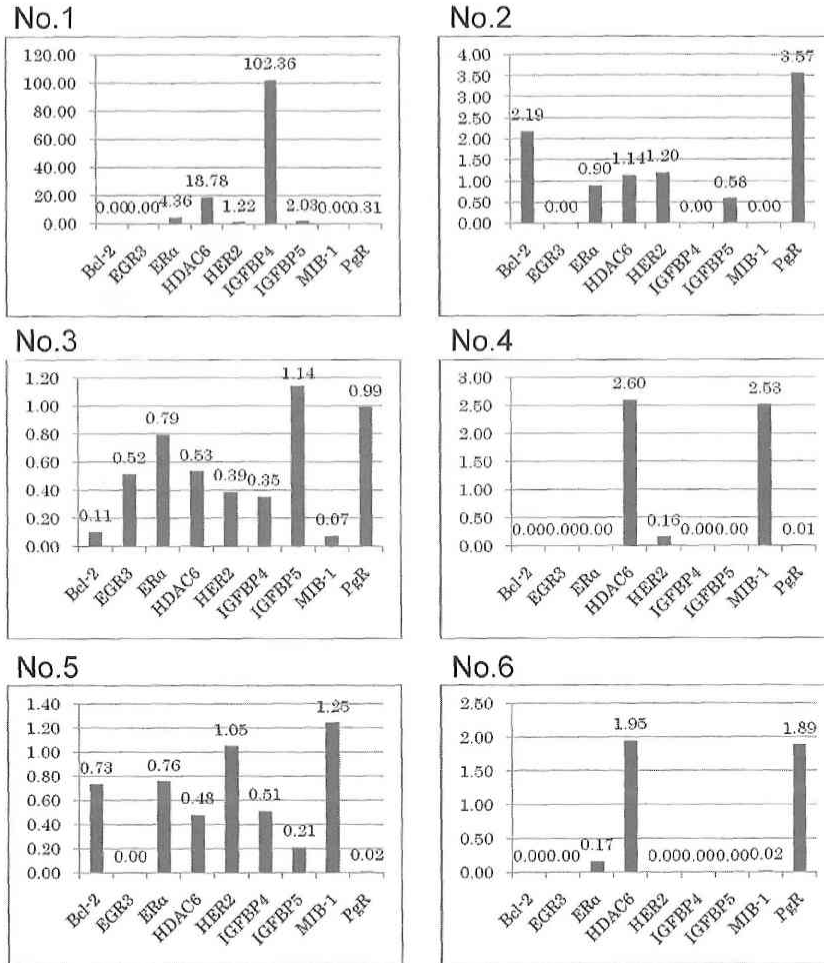


図4. 各サンプルの mRNA 相対発現定量値

変性していると思われる No.1 を除いた No.2~6 の 5 サンプルの発現量の平均値に対して、そのサンプルの発現量が何倍かを示している。発現様式はサンプルごとに様々で、従来の報告通りのものもあれば、かけ離れたものも存在する。サンプル数が少ないため全体の傾向は把握できないが、症例の多様性をうかがうことができる(本文参照)。

(1993, 2002) または免疫染色 (2006) によるタンパク発現結果と比較した (図5)。その結果、EIA と免疫染色の違いはあるが、すべてのサンプルにおいてタンパク発現と mRNA 発現に相関する傾向がみられた。すなわち、ER や PgR がタンパクレベルで陽性と判定された No.2,3,5 (ER), 6 (PgR) はその mRNA 発現レベルも高く、逆に陰性と判定された No.4 や No.5 (PgR) は mRNA をほとんど検出することができなかった。また、偶

然にもこれらの傾向は mRNA の劣化が疑われる No.1 にも当てはまった。これは FFPE から抽出した mRNA の解析の信用性を裏付けるだけでなく、mRNA 発現解析が予後診断の因子として用いることができる可能性を示唆している。ER や PgR 以外の ER 標的遺伝子発現のサンプルごとの多様性を考えれば、これら標的遺伝子を用いて大規模な統計解析を行うことにより、症例の多様化に対応する新規の診断基準が定義できるかもし

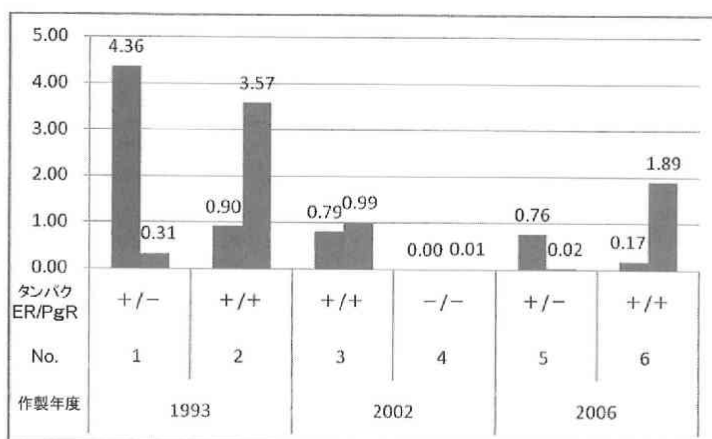


図5. サンプルごとの ER, PgR のタンパク発現と mRNA 発現量の比較

乳癌の予後診断の指標となっている ER と PgR について、結果を以前行われた EIA または免疫染色によるタンパク発現結果と比較した。その結果、EIA と免疫染色の違いはあるが、すべてのサンプルにおいてタンパク発現と mRNA 発現に相関する傾向がみられた。

れない。

今回の目的は FFPE からの RNA 抽出、解析の是非にあり、各年度 2 つという少ないサンプル数での試験的な測定実験であった。新鮮凍結切片のような RNA の品質が高いサンプルと比較しなかったこともあり、より正確な測定を行うための条件検討には詳細な追加実験が必要である。また、今回はサンプル数が少なかったため濃度測定後に即逆転写反応を行い、インターナルコントロールの定量値で品質の良否を検討したが、実際に数多くの検体の解析を行う際はそれらすべての検体に対して逆転写反応を行うよりは、やはりまず RNA Analyzer など RNA の品質を直接判定できる機器を利用し、その損失や劣化の程度の確認によりサンプルの取舍を行った方が手間とコストの観点からも良いと思われる。しかしながら、試験的ではあるものの、少ないサンプル数の中でも臨床報告を裏付けるようなデータと、患者群の多様性を考えていく上で今後の解析の参考となる結果を得ることができ、今後の解析の必要性を十分に明示できたと考えられる。

終わりに

パラフィン包埋の技術は、切片を作製すると同

時にその組織の半永久的な保存を可能にする。それは世界中のあらゆる施設で利用されている最も基本的な組織保存技術であり、作製方法に大きな違いがない、すなわちサンプル間で組織や遺伝子の保存状態がある程度は同じであるという特徴がある。この FFPE の遺伝子解析を高い信頼性をもって行うことができるようになれば、その性質の普遍性と保存数を利用した大規模な retrospective な検索や過去の形態学的診断と対応させた研究も可能となる。今回のような FFPE の解析における手法の改良やその実用化が、今後の様々な研究に対して貢献することを期待する。

文 献

- 1) Gradishar, W.J.: Tamoxifen-What Next?, The Oncologist, 9, 378-384, 2004
- 2) Lin, N.U., Winer, E.P.: Advances in Adjuvant Endocrine Therapy for Postmenopausal Women, J. Clin. Oncol., 26, 798-805, 2008
- 3) Zhu, L., Chow, L.W., Loo, W.T., Guan, X.Y., Toi, M.: Her2/neu Expression Predicts the Response to Antiaromatase Neoadjuvant Therapy in Primary Breast Cancer, Clin. Cancer Res., 10, 4639-4644, 2004
- 4) Srinivasan, M., Sedmak, D., Jewell, S.: Effect

- of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids, *Am. J. Pathol.*, **161**, 1961-1971, 2002
- 5) Ding, J., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., Shimada, H.: Effect of formalin on extraction of mRNA from a formalin-fixed sample: a basic investigation, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **64**, 229-235, 2004
 - 6) Masuda, N., Ohnishi, T., Kawamoto, S., Monden, M., Okubo, K.: Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples, *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4436-4443, 1999
 - 7) Stoler, M.H., Broker, T.R.: In situ hybridization detection of human papillomavirus DNAs and messenger RNAs in genital condylomas and a cervical carcinoma, *Hum. Pathol.*, **17**, 250-258, 1986
 - 8) Rupp, G.M., Locker, J.: Purification and analysis of RNA from paraffin-embedded tissues, *Biotechniques*, **6**, 56-60, 1988
 - 9) Stanta, G., Schneider, C.: RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification, *Biotechniques*, **11**, 304, 306, 308, 1991
 - 10) Benchekroun, M., DeGraw, J., Gao, J., Sun, L., von Boguslawsky, K., Leminen, A., Andersson, L.C., Heiskala, M.: Impact of fixative on recovery of mRNA from paraffin-embedded tissue, *Diagn. Mol. Pathol.*, **13**, 116-125, 2004
 - 11) Krafft, A.E., Duncan, B.W., Bijwaard, K.E., Taubenberger, J.K., Lichy, J.H.: Optimization of the Isolation and Amplification of RNA From Formalin-fixed, Paraffin-embedded Tissue: The Armed Forces Institute of Pathology Experience and Literature Review, *Mol. Diagn.*, **2**, 217-230, 1997
 - 12) Penault-Llorca, F., André, F., Sagan, C., Lacroix-Triki, M., Denoux, Y., Verrièle, V., Jacquemier, J., Baranzelli, M.C., Bibeau, F., Antoine, M., Lagarde, N., Martin, A.L., Asselain, B., Roché, H.: Ki67 Expression and Docetaxel Efficacy in Patients With Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer, *J. Clin. Oncol.*, 2009: <http://jco.ascopubs.org/cgi/content/abstract/JCO.2008.18.2808v1>